

1702 ^{123}I -MIBG を用いた消化管吸収機能の選択的測定法の検討

神山 友里恵

(指導教員：川井 恵一 教授)

要旨：小腸の消化管吸収機能が低下すると、経口薬が体内に十分に吸収されず、十分な効果が得られないため、消化管吸収機能の選択的測定が重要である。本研究では、 ^{123}I 標識 3-iodobenzylguanidine (^{123}I -MIBG) に着目し、イメージングによる消化管吸収機能の選択的な測定法の開発を目指した。まず、 ^{123}I -MIBG の細胞取り込み機序を解明するため、薬物トランスポーターを高発現させた Human embryonic kidney (HEK) 細胞を用いて取り込み実験を行った結果、 ^{123}I -MIBG は主に organic cation transporter (OCT) から取り込まれることが確認された。そこで、 ^{123}I -MIBG をマウスに経口投与し、体内分布実験及び経時的イメージング実験を行った。その結果、消化管の集積が経時的に減少しているのに対し、各臓器の集積は増加しており、消化管吸収機能を反映していることが観察された。したがって、 ^{123}I -MIBG を経口投与した場合、イメージングにより OCT を介した消化管吸収機能を測定できる可能性が示された。また、消化管吸収機能が低下した疾患モデルとして OCT 阻害剤である cimetidine を経口投与し、イメージングを行った。その結果、阻害剤負荷時はコントロールと比較して集積が低下せず、阻害効果は確認できなかった。これは、阻害剤として使用した cimetidine が消化管から吸収された後、腎臓に発現している尿細管分泌に関与する OCT を阻害し、 ^{123}I -MIBG が排泄されずに血中に残留したことが原因であると考えられた。

I. はじめに

経口薬を摂取すると、薬剤は胃を通り小腸に運ばれ、小腸に発現している薬物トランスポーターを介して血管内に移行し、全身に供給される。しかし、小腸の消化管吸収機能が低下している場合、薬剤が吸収されにくくなり、その効果を十分に発揮できない。現在、経口薬投与後の血液分析により消化管吸収機能を評価することも可能である¹⁾。しかし、この方法は採血を行うため侵襲的であり、薬剤が全身に分布した後の代謝の影響を受ける。以上より、消化管吸収機能のみを選択的に測定する方法の確立が重要であると考えた。

現在、心筋交感神経シンチグラフィや腫瘍シンチグラフィに臨床使用されている ^{123}I -MIBG は、代謝安定性が高く、薬物トランスポーターの評価に適すると考えられる。そこで本研究では、 ^{123}I -MIBG に着目し、 ^{123}I -MIBG を用いたイメージングによる消化管吸収機能の選択的測定法の開発を目指した。

II. ヒト由来 SLC トランスポーター強制発現系 HEK 細胞を用いた ^{123}I -MIBG の取り込み機序の検討

A) 実験材料と方法

放射性医薬品として富士フィルム RI ファーマより「ミオ MIBG-123 注射液 (111 MBq/1.5 mL)」の提供を受け、使用した。取り込み型薬物トランスポーターとして発現していることが報告されている SLC トランスポーター (OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OAT2, OCT1, OCT2, NTCP) を遺伝子操作によって選択的かつ強制的に高発現させた各 HEK 細胞と遺伝子操作を行っていない HEK-Mock (control) を用いて、SLC トランスポーターによる ^{123}I -MIBG の細胞取り込み機序を評価した。

実験 1 日前に各 HEK 細胞 (OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OAT2, OCT1, OCT2, NTCP, Mock) を 4×10^5 cells/well で 12 ウェルチャンバーに播き、10% ウシ胎児血清 (fatal bovine serum, Gibco) 及び 1% sodium pyruvate (Sigma) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Wako) を培地として 5% CO_2 、37°C 環境下で培養した。

実験当日に培地を除去し、測定用培地 (modified hanks' balanced salt solution : MHBS) を 1 分間隔で 400 μL 加え、10 分間プレインキュベートした。その後、トレーサーとして ^{123}I -MIBG (18.5 kBq/50 μL) を加え、5 分間インキュベートした。1 分間隔で ^{123}I -MIBG を含んだ MHBS を取り除き、500 μL の MHBS で 2 回ずつ洗浄した。0.1 M NaOH を 500 μL 加え細胞を溶解し、10 分間インキュベートした後、溶液を 300 μL を採取し、オートウェルガンマカウンタ (Accuflex γ 7000, Aloka) で測定した。測定結果は 1 mg の蛋白量あたりに含まれる ^{123}I -MIBG の濃度で表した。

B) 結果と考察

^{123}I -MIBG の HEK 細胞への集積を Fig. 1 に示す。OAT2, OCT1, OCT2 高発現細胞では、HEK-Mock と比較して有意に集積が増加したことから、 ^{123}I -MIBG は OAT2, OCT1, OCT2 で取り込まれることが確認された。また、本実験で用いた HEK 細胞のうち、小腸には OATP2B1 と OCT1 が発現していることが報告されている²⁾。したがって、 ^{123}I -MIBG の消化管吸収には OCT1 が関与するものと推測された。

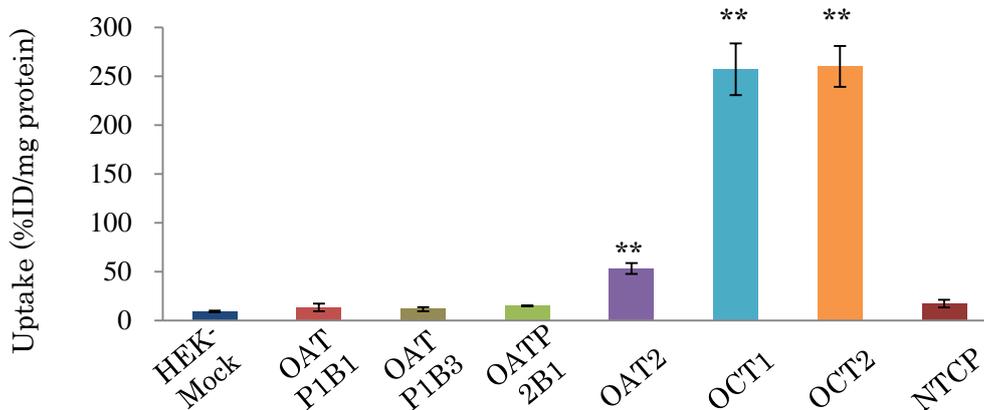


Fig. 1 ^{123}I -MIBG の HEK 細胞への集積

** $p < 0.01$ compared with HEK-Mock

III. 正常マウス体内分布実験

A) 実験材料と方法

^{123}I -MIBG を 185 kBq/200 μL となるように生理食塩水で希釈し、経口ゾンデ (Fuchigami) を用いて ddY マウス (雄、6 週齢、日本 SLC) に 1 匹当たり 185 kBq/200 μL を経口投与方法として胃内投与した。一定時間 (10 分、30 分、60 分) 後、isoflurane (Wako) 麻酔下で心臓採血を行い、頸椎脱臼によりマウスを屠殺した。その後、速やかに各臓器 (脳、甲状腺、心臓、肺、肝臓、胆嚢、膵臓、胃、小腸、大腸、腎臓、筋肉、骨) を摘出し (n=4)、それぞれの湿重量と放射能を電子天秤 (Shimadzu) 及びオートウェル γ カウンタで測定した。

B) 結果と考察

経口投与後の血液と、摘出臓器のうち高い集積を示した肝臓及び ^{123}I -MIBG の特異的集積組織である心臓の重量集積率を Fig. 2 に示した。血液の集積は経時的に増加し、経口投与された ^{123}I -MIBG が小腸から吸収され、徐々に血中へと移行していることが確認された。また、肝臓と心臓では、小腸からの吸収に伴い経時的に集積が増加していた。したがって、経口投与された ^{123}I -MIBG は、小腸から徐々に吸収され、各臓器へと移行することが確認された。また、血中濃度をはじめとする重量集積率のばらつきは経静脈投与時よりも大きい傾向があったが、これは消化管吸収には個体差が大きいためだと推察される。

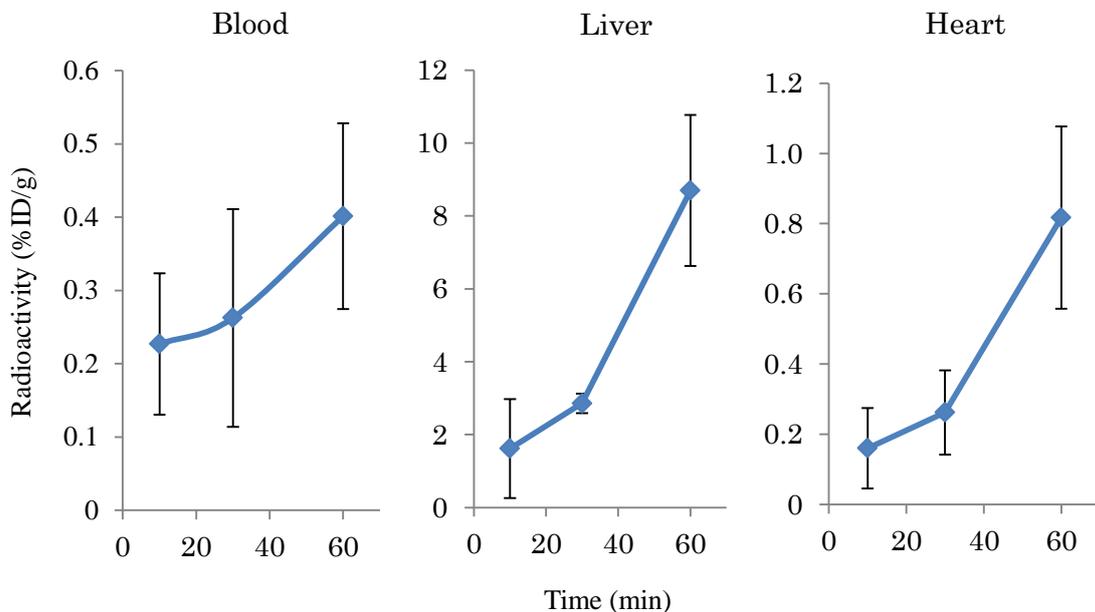


Fig. 2 経口投与による各組織の重量集積率

IV. 小動物用 SPECT/PET/CT 装置によるイメージング

A-1) 正常マウスイメージング

イメージング装置は、本学アイソトープ総合研究施設所有の小動物用 SPECT/PET/CT 装置 (Vector⁺/CT, Milabs) を使用した。あらかじめ24時間絶食しておいた ddY マウス (雄、6 週齢) に生理食塩水 70 μL を経口投与し、5 分後に ^{123}I -MIBG を 20 MBq/180 μL 経口投与した。Isoflurane 麻酔下にて X 線 CT を撮像した後、 ^{123}I -MIBG 投与 5 分後から 90 分間撮像を行った (n=3)。画像再構成アルゴリズムには逐次近似法のひとつである最尤推定-期待値最大化 (maximum likelihood expectation maximization : ML-EM) 法を使用し、5 分毎、17 フレームの画像データを作成した。解析ソフトウェアには π . pmod (ver.3.5, Pmod Technologies) を使用し、CT 画像と SPECT 画像を重ね合わせたフュージョン画像を作成した。また、90 分間の画像データから肝臓、心臓、膀胱、胃、消化管全体 (胃、小腸、大腸) に関心領域 (ROI) をそれぞれ設定し、経時的集積曲線を作成した。グラフの縦軸は、各臓器に集積した放射能を、予め撮像しておいたシリンジのカウントを投与放射能として補正し、%ID を算出した。

A-2) 結果と考察

経口投与後の SPECT 画像と CT 画像のフュージョン画像を Fig. 3 に示す。経口投与直後の 5-10 分では胃と小腸に高い集積が見られたが、経時的に低下し、30-35 分では肝臓、60-65 分では膀胱の集積が増加した。したがって、経口投与された ^{123}I -MIBG が消化管から徐々に吸収され、各組織へと移行する様子がイメージング画像から観察できることが確認された。

また、経時的集積曲線を Fig. 4 に示す。消化管全体の集積が経時的に減少しているのに対し、他の臓器の集積は増加する傾向が確認された。この Fig. 2 に示した体内分布実験に類似した経時的な集積の増加は、消化管からの吸収に依存していることから、肝臓や心臓の集積を経時的に測定することで、イメージングでも消化管吸収機能を評価できると考えられた。

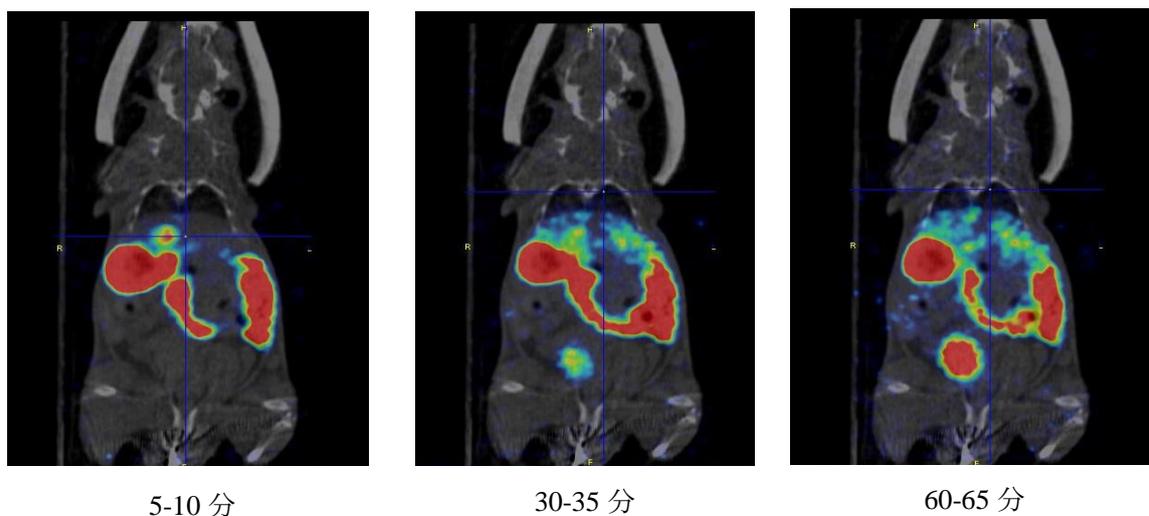


Fig. 3 ^{123}I -MIBG 経口投与マウスの SPECT/CT 画像

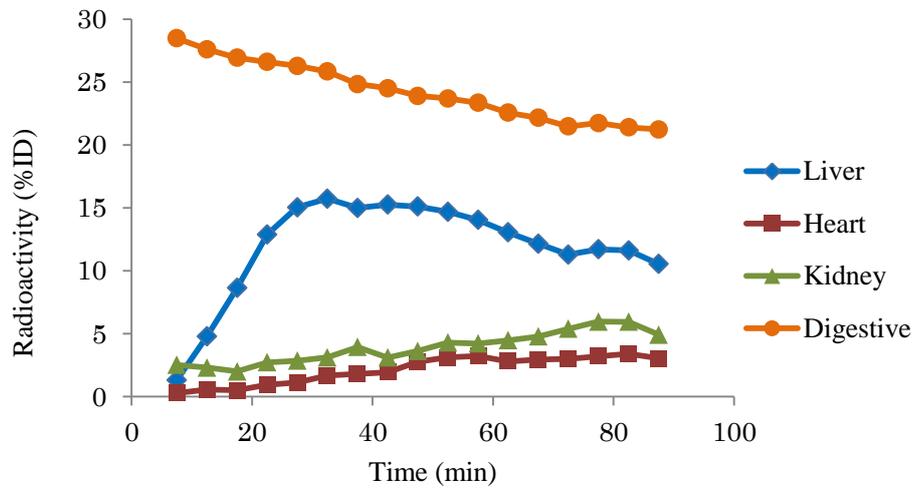


Fig. 4 ^{123}I -MIBG 経口投与マウスの経時的集積曲線

B-1) OCT 阻害マウスイメージング

阻害剤を用いて消化管に発現する OCT からの吸収を阻害し、吸収機能の低下した疾患モデルとしてイメージングを行った。阻害剤負荷時においては、OCT 阻害剤である cimetidine (Nacalai tesque, 2 mM) を ^{123}I -MIBG 経口投与の 5 分前に 70 μL 経口投与した³⁾。その他についてはIV.A-1) と同条件で撮像を行い、経時的集積曲線を作成した (n=3)。

B-2) 結果と考察

肝臓と心臓におけるコントロールと阻害剤負荷時の経時的集積曲線を Fig. 5 に示す。

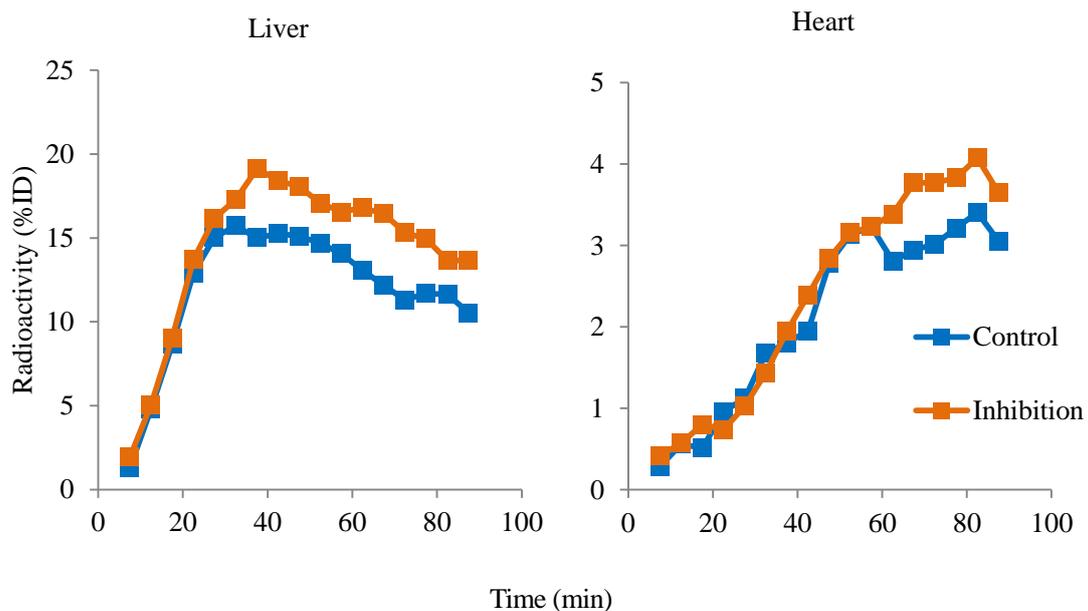


Fig. 5 ^{123}I -MIBG 経口投与マウスの経時的集積曲線

阻害剤負荷時はコントロールと比較し集積が低下せず、投与後晩期にはコントロールよりも集積が増加した。これは、阻害剤として使用した *cimetidine* が消化管から吸収された後、腎臓に発現している尿細管分泌に関与する OCT を阻害し、¹²³I-MIBG が排泄されずに血中に残留したことが原因であると考えられる。したがって、消化管吸収に関与する OCT を欠損させたモデル動物を使用するなど、消化管吸収に関与する OCT のみを阻害することで、¹²³I-MIBG を用いた疾患モデルのイメージング評価が可能になると考えられた。

V. 結語

HEK 細胞を用いた ¹²³I-MIBG の細胞取り込み実験により、¹²³I-MIBG の消化管吸収には OCT が関与していることが確認された。これを基に ¹²³I-MIBG 経口投与時のマウス体内分布実験とイメージングでの検討を行った結果、経口投与された ¹²³I-MIBG は小腸から徐々に吸収され、各臓器へと移行する様子が観察された。また、正常マウスイメージングにおける経時的集積曲線より、消化管全体の集積が経時的に減少しているのに対し、他の臓器の集積は増加する傾向があることが確認された。この経時的な集積の増加は、消化管からの吸収に依存していることから、¹²³I-MIBG の経口投与イメージングにおいて肝臓や心臓の集積を経時的に測定することにより、OCT を介した消化管吸収機能を評価できる可能性が示された。

VI. 謝辞

本研究を終えるにあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、健康増進科学センター小林正和助教、本研究室大学院生井原正明さん、ご協力いただきました本研究室の方々へ心より感謝申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) Ahmed T.A.: Pharmacokinetics of drugs following IV bolus, IV infusion, and oral administration. Intech, DOI, 10.5772/61573 (2015)
- 2) Proctor W.R., Ming X., Bourdet D., Han T.K., Everett R.S., Thakke D.R.: Why does the intestine lack basolateral efflux transporters for cationic compounds? A provocative hypothesis. *J. Pharm. Sci.* 105 (2) : 484-496 (2016)
- 3) Minematsu T., Iwai M., Umehara K., Usui T., Kamimura H.: Characterization of human organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1)-and OCT2 (SLC22A2)-mediated transport of 1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(pyrazine-2-ylmethyl)-4,9-dihydro-1H-naphtha [2,3-d] imidazolium bromide (YM155 monobromide), a novel small molecule survivin suppressant. *Drug Metab Dispos* 38 (1) : 1-4 (2010)